Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n .

REAKTIONSBEDINGUNGEN EINIGER PHOSPHOLIPASEN VOM TYP A BEI MANOMETRISCHER BESTIMMUNG.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ingrid F i s c h e r

aus Kassel

Würzburg 1957

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549803_0020

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n .

REAKTIONSBEDINGUNGEN EINIGER PHOSPHOLIPASEN VOM TYP A BEI MANOMETRISCHER BESTIMMUNG.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ingrid F i s c h e r

aus Kassel

Würzburg 1957

Referent: Privatdozent Dr. med. E. H a b e r m a n n
Korreferent: Professor Dr. med. Dr. phil. W. N e u m a n n

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündl. Prüfung:
11. April 1957.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M E I N E N L I E B E N E L T E R N

Inhaltsübersicht

Methodik	Seite	1
Eigene Untersuchungen	"	3
I. Versuche mit Bienen- und Schlangengiften	"	3
1. Angreifbarkeit verschiedener Eigelbarten	"	3
2. pH- Optimum der Gifte von Naia tripudians u. Crotalus terrificus	"	5
a) Tripudiansgift	"	5
b) Crotalus-terrificus-Gift	"	7
3. Aktivitätsänderung durch Zusatz von verschiedenen Stoffen	"	9
a) Aktivierung von Bienengift durch Albumin	"	9
b) Aktivierung von Bienengift durch Desoxycholsäure	"	11
c) Frage des Einflusses von Triglyceriden u. Cholesterin	"	12
d) Frage der Hemmbarkeit durch Arsanilsäure	"	13
II. Versuche mit gereinigter Phospholipase	"	14
1. Ermittlung des pH- Optimums	"	14
2. Aktivierung durch Albumin	"	15
3. Zeitabhängigkeit der Aktivität	"	16
a) in Abwesenheit von Albumin	"	16
b) in Anwesenheit von Albumin	"	17
4. Vergleich verschiedener phospholipasehaltiger Präparate	"	18
III. Versuche mit Crotoxin	"	22
1. Zeitabhängigkeit von Crotoxin mit u. ohne Albuminzusatz	"	22
2. Aktivitätsänderung von Crotoxin bei Zusatz von Albumin	"	23
Besprechung	"	24
Zusammenfassung	"	25
Literaturverzeichnis	"	27

Da Phospholipase A, wie auch andere Esterasen, saure Gruppen freisetzt, lag es nahe, ein manometrisches Verfahren zu ihrer Bestimmung auszuarbeiten. ZAMECNIK u. LIPMANN haben bereits die Aktivität der Phospholipase A des Crotalus-terrificus-Giftes im Warburg-Apparat orientierend geprüft. WAGNER hat am Würzburger Pharmakologischen Institut auf der Grundlage älterer Untersuchungen von HABERMANN das Verhalten der Phospholipase A von rohem oder teilweise gereinigtem Bienengift eingehend studiert. Dabei stellte sich heraus, daß dieses Enzym von sehr vielen Faktoren beeinflußt werden kann. Ähnlich wie Lipasen wird es durch Calziumionen und lösungsvermittelnde Verbindungen stark aktiviert. Es besteht eine starke Abhängigkeit vom Verteilungsgrad und von der Konzentration des Lecithins, ebenfalls von der Menge der im Ansatz vorhandenen Spaltungsprodukte, von denen Lysocithin aktiviert, Ölsäure hingegen hemmt. Aber nicht nur die im Ansatz gelösten Substanzen beeinflussen das Enzym, sondern sogar die Beschaffenheit des Glases, aus dem das Reaktionsgefäß besteht. Das erschwerte natürlich die vergleichende Testung von Phospholipase A-Präparaten verschiedener Herkunft und verschiedenen Reinheitsgrades.

Da es um die gleiche Zeit HABERMANN u. NEUMANN gelang, ein weitgehend gereinigtes Phospholipase-Präparat darzustellen, zeigte sich immer mehr das Bedürfnis nach einer zuverlässigen manometrischen Phospholipase-Bestimmung. Aus diesem Grunde wurde die hier vorliegende Arbeit begonnen. Ihr Ziel war es, durch eingehende Prüfung der Wirkungsbedingungen von Phospholipasen verschiedener Herkunft günstige Standardbedingungen zu ermitteln, unter denen die gereinigten Präparate untersucht werden konnten.

Methodik.

Prinzip:

Bei der Spaltung von Lecithin in Lysocithin und Fettsäure entsteht pro Mol Lecithin ein Äquivalent Säure. Dadurch wird das im Ansatz vorliegende Gleichgewicht $H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$ nach rechts verschoben. Pro Mol Lecithin wird also ein Mol CO_2 freigesetzt.

Versuchsvorbereitung:

Die Reaktionsgefäße wurden in Xylol gebracht, 1/2 Stunde in Persilwasser gekocht, mit Leitungswasser abgespült, für eine Stunde in heiße Chromschwefelsäure gelegt und abschließend abermals mit Leitungswasser sowie mit destilliertem Wasser gespült.Die getrockneten Manometerkölbchen versah man mit einem Überzug von "Desicote", spülte auch dann wieder mit Leitungswasser sowie mit Aqua bidest. und trocknete sie.

Persil konnte nicht durch das ebenfalls im Haushalt verwendete,kräftiger wirkende Valan ersetzt werden, da hierbei erhebliche Niederschläge auftraten.

Beim Fetten der Manometerschliffe wurde darauf geachtet, daß kein Fett in das Kölbcheninnere gelangte; denn beim Durchströmen der Apparatur mit Kohlendioxyd absorbiert das Fett CO_2, welches bei der während des Versuches herrschenden Temperatur von 38° C zum Teil wieder abgegeben wird.

Nur bei strikter Einhaltung dieser Vorbedingung kann man reproduzierbare Werte erwarten. - Streuungen traten nicht nur allein von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß auf, sondern auch von Versuchstag zu Versuchstag, und die Differenz war besonders groß, wenn die Arbeit für längere Zeit unterbrochen worden war.

Versuchsausführung:

Der Standardansatz aller Versuche hatte die folgende Zusammensetzung: Das Hauptgefäß des Warburg-Manometer-Kölbchens enthielt 3 ccm Reaktionsgemisch und der Seitenarm 0,3 ccm einer Lösung von Gift bzw. gereinigter Phospholipase A.Das Reaktionsgemisch setzte sich, wenn beim jeweiligen Versuch nicht besonders vermerkt, aus 1 ccm 2 % iger Lecithinemulsion, 1 ccm Tween 20 12,5 %, 0,5 ccm 0,005 m $CaCl_2$ und 0,5 ccm 0,3 m $NaHCO_3$ zusammen.Statt gereinigten Lecithins wurde auch Eigelb als Substrat benutzt; das Reaktionsgemisch enthielt dann 1 ccm 20 % ige Eigelbverdünnung in physiologischer Kochsalzlösung + 1 ccm 0,3 m $NaHCO_3$ + 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung.In allen Fällen enthielten Hauptgefäß und Seitenarm die gleiche Bicarbonatkonzentration.

Folgende Werte (cmm CO_2 / 30 min) geben einen Überblick über die Streuung:

a) Ansatz mit Eigelb, γ ger. Bienengift / Ansatz
101, 99, 99, 95, 92, 92, 91, 90

b) Ansatz mit Lecithin, γ ger. Bienengift / Ansatz
65, 63, 59, 59, 59, 58, 57,56

Substanzen:

Lecithin aus Eigelb; von HABERMANN nach HANAHAN chromatographisch gereinigt und unter Aceton in der Tiefkühltruhe deponiert.

Tween 20 als Lösungsvermittler; durch die Firma C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim vermittelt.

Gereinigtes Bienengift (Pikratgift), Charge 52 sowie Nativgift, Charge 2 / 48 der Firma H. Mack Nachf., Illertissen.

Gifte von Naia tripudians und Crotalus terrificus: bezogen von der Firma Basilisk, Basel.

Crotoxin (aus Crotalus-terrificus-Gift) überließ uns freundlicherweise Herr Professor Dr. K. Slotta, Sao Paulo.

Die Reinigungsstufen von Phospholipase A stellte HABERMANN am hiesigen Pharmakologischen Institut dar.

Die Warburg-Kölbchen stammten von der Firma Braun, Melsungen, und der Firma Machlett, Chicago.

Von der Firma Beckman, Pasadena, Kalifornien wurde das Silikon-Präparat "Desicote" bezogen.

Aus Platzmangel mußten in den meisten Tabellen folgende Abkürzungen benutzt werden:

Pg = Pikratgift
trip = Tripudiansgift
ct = Crotalus-terrificus-Gift
Plip = gereinigte Phospholipase A

Eigene Untersuchungen

I. Versuche mit Bienengift und Schlangengift.

1. Angreifbarkeit verschiedener Eigelbarten.

Da wir daran anfangs interessiert waren, auf möglichst einfachem Wege reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, verwendeten wir anstatt einer Suspension von Lecithin eine Eigelbverdünnung. Vorbedingung für allgemeine Brauchbarkeit wäre jedoch gewesen, daß Eigelb verschiedener Herkunft durch eine bestimmte Enzymkonzentration in gleicher Weise angegriffen würde.

Tabelle 1: Vergleich der Spaltbarkeit von Eigelb verschiedener Herkunft.

1 ccm	2 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/30 Min.	Mittelwerte nach Berücksichtigung des Leerwertes
1) Eigelb I 20%	$NaHCO_3$ 0,15m	Pg 1:40000	94	
2) "		"	87	106
3) "		NaCl 0,85%	-16	
4) Eigelb II 20%		Pg 1:40000	98	
5) "		"	90	109
6) "		NaCl 0,85%	-15	
7) Eigelb III 20%		Pg 1:40000	93	
8) "		"	92	100
9) "		NaCl 0,85%	-7,5	
10) Eigelb IV 20%		Pg 1:40000	115	
11) "		"	115	123
12) "		NaCl 0,85%	-8,5	
13) Eigelb V 20%		Pg 1:40000	101	
14) "		"	101	107
15) "		NaCl 0,85%	-6,0	

Ergebnis: Der Versuch zeigt, daß Eigelb verschiedener Herkunft bei der manometrischen Testung nicht gleich gut gespalten wird. Die Ursache hierfür könnte in unterschiedlichem Lecithin- oder Ca^{++}-Gehalt oder auch in verschiedenem Emulsionsgrad des Lecithins zu suchen sein.

Die relativ hohen Leerwerte sind dadurch zu erklären, daß der Inhalt des Seitenarmes bei diesem Versuch noch nicht, wie in der Methodik angegeben, bicarbonathaltig war.

2) pH-Optimum der Gifte von Naia tripudians und Crotalus terrificus.

a) Tripudiansgift.

Ansatz:

	1 ccm	0,5 ccm	1 ccm	0,5ccm	0,25 ccm	0,05ccm	cmm CO_2/30 Min.	pH
1.	Lec.2%	$CaCl_2$ 0,005 m	Tween 20 12,5%	$NaHCO_3$ 0,3m	trip. 1:5000	$NaHCO_3$ 0,3 m	48	
2.	"	"	"	"	"	"	45	6,68
3.	"	"	"	"	NaCl	"	5,5	
4.	"	"	"	$NaHCO_3$ 0,6m	trip. 1:5000	$NaHCO_3$ 0,6m	62	
5.	"	"	"	"	"	"	60	6,98
6.	"	"	"	"	NaCl	"	5,0	
7.	"	"	"	$NaHCO_3$ 1,2m	trip. 1:5000	$NaHCO_3$ 1,2m	64	
8.	"	"	"	"	"	"	66	7,28
9.	"	"	"	"	"	"	3,0	
10.	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	Thermobarometer	
11.	Lec.2%	$CaCl_2$ 0,005 m	Tween 20 12,5%	$NaHCO_3$ 0,3m	trip. 1:5000	$NaHCO_3$ 0,3 m	93	
12.	"	"	"	"	"	"	86	8,02
13.	"	"	"	"	NaCl	"	0,5	
14.	"	"	"	$NaHCO_3$ 0,6m	trip. 1:5000	$NaHCO_3$ 0,6m	104	
15.	"	"	"	"	"	"	101	8,32
16.	"	"	"	"	NaCl	"	1,5	
17.	"	"	"	$NaHCO_3$ 1,2m	trip. 1:5000	$NaHCO_3$ 1,2m	44	
18.	"	"	"	"	"	"	30	8,62
19.	"	"	"	"	NaCl	"	3,0	
20.	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	Thermobarometer	

1 - 10 im Gleichgewicht mit CO_2 (100% ig),

11 - 20 im Gleichgewicht mit N_2 - CO_2 (95:5).

Errechnung der pH-Werte nach der Hasselbach'schen Formel:

$pH = P_K + \log\left[NaHCO_3\right] - \log\left[P\ CO_2\right] - \log \frac{\alpha}{760 \cdot 22,4}$

P_K = const.

P CO_2 = CO_2-Druck in mm Hg

α = Löslichkeit von CO_2 bei 38° C (cmm Gas/cmm Flüssigkeit)

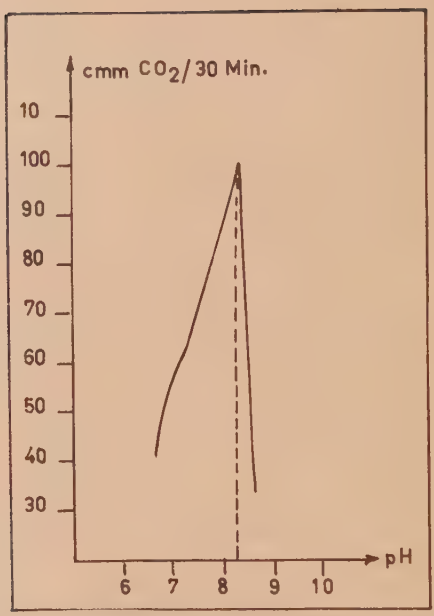

Abb. 1 pH-Abhängigkeit der Lecithinspaltung durch Tripudiansgift.
Ordinate: cmm CO_2/30 Min.
Abszisse: pH
Ansätze: siehe Text.
Bei der graphischen Darstellung liegen die aus der Tabelle des Ansatzes zu entnehmenden CO_2-Werte korrigiert und gemittelt vor.

b) Crotalus-terrificus-Gift.

Ansatz:

	1 ccm	0,5ccm	1 ccm	0,5ccm	0,25ccm	0,05ccm	cmm CO_2/30 Min.	pH
1.	Lec.2%	$CaCl_2$ 0,005 m	Tween 20 12,5%	$NaHCO_3$ 1,2 m	ct.1:3000	$NaHCO_3$ 1,2m	31	
2.	"	"	"	"	"	"	30	7,28
3.	"	"	"	"	NaCl	"	-8,0	
4.	"	"	"	$NaHCO_3$ 0,3m	ct.1:3000	$NaHCO_3$ 0,3m	8,5	
5.	"	"	"	"	"	"	3,5	6,68
6.	"	"	"	"	NaCl	"	-4,5	
7.	"	"	"	$NaHCO_3$ 0,6m	ct.1:3000	$NaHCO_3$ 0,6m	22	
8.	"	"	"	"	"	"	20	6,98
9.	"	"	"	"	NaCl	"	9,0	
10.	NaCl	"	"	$NaHCO_3$ 0,6m	NaCl	$NaHCO_3$ 0,6m	Thermobaro-meter	
11.	Lec.2%	"	"	"	ct.1:3000	"	103	
12.	"	"	"	"	"	"	93	8,32
13.	"	"	"	"	NaCl	"	1,5	
14.	"	"	"	$NaHCO_3$ 0,3m	ct.1:3000	$NaHCO_3$ 0,3m	114	
15.	"	"	"	"	"	"	105	8,02
16.	"	"	"	"	NaCl	"	-3,5	
17.	"	"	"	$NaHCO_3$ 1,2m	ct.1:3000	$NaHCO_3$ 1,2m	2,5	
18.	"	"	"	"	"	"	2,5	8,62
19.	"	"	"	"	NaCl	"	-5,5	
20.	NaCl	"	"	$NaHCO_3$ 0,6m	NaCl	$NaHCO_3$ 0,6m	Thermobaro-meter	

1 - 10 im Gleichgewicht mit CO_2 (100% ig)
11 - 20 im Gleichgewicht mit N_2 - CO_2 (95:5)

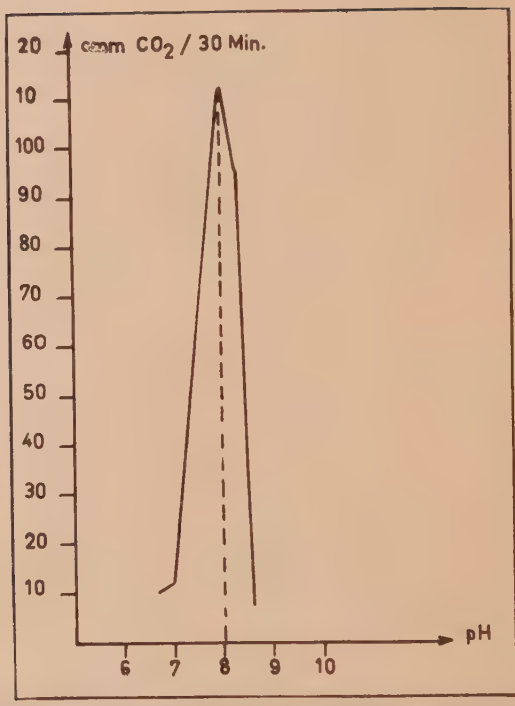

Abb. 2 pH-Abhängigkeit der Lecithinspaltung durch Crotalus-terrificus-Gift.
Ordinate: cmm CO_2/30 Min.
Abszisse: pH
Ansätze : siehe Text.

Ergebnis: Ähnlich wie die Bienengiftphospholipase (WAGNER, HABERMANN) hat auch die von Crotalus-terrificus-Gift sowie Naia-tripudians-Gift ein enges pH-Optimum zwischen pH 8,02 und 8,32,wobei das von Crotalus-terrificus-Gift etwas weiter im Sauren liegt.Der Abfall der Kurven,insbesondere zum Alkalischen hin, ist sehr steil.

3. Aktivitätsänderung durch Zusatz von verschiedenen Stoffen.

Die Suche nach Substanzen, welche die Aktivität von Phospholipase A im positiven oder negativen Sinne beeinflussen, war von großem Interesse; denn die Einwirkung des Enzyms auf gereinigtes Lecithin ist überhaupt nur nach Aktivierung gut zu erfassen. Wir bemühten uns daher, in den Bereich der optimalen Reaktionsbedingungen zu gelangen. Über Aktivatoren im Hämolyseansatz wurde von NEUMANN und HABERMANN, über Aktivatoren im manometrischen Ansatz von WAGNER berichtet. Unter beiden Bedingungen begünstigten Calziumionen stark, während Schwermetallionen (Hg^{++}, Zn^{++}) sowie Fluorid hemmten.

Wir versuchten dieses Bild weiter abzurunden. WILLSTÄTTER fand bei Untersuchungen über Pankreaslipase, daß neben Ca^{++} auch Desoxycholsäure und Albumin für eine ausgleichende Aktivierung, d.h. als Ersatz für bei der Reinigung verlorengegangene Aktivatoren verwendet werden können. Da nach NEUMANN und HABERMANN Proteine im Hämolyseansatz die Enzymwirkung verstärkten, war zu erwarten, daß auch unter den Bedingungen des manometrischen Ansatzes das Gleiche zu beobachten sein würde. Desoxycholsäure konnte im Hämolyseansatz nach NEUMANN und HABERMANN nicht geprüft werden, weil es "direkt" hämolysiert hätte.

a) Aktivierung von Bienengift durch Albumin.

Ansatz:

Nr.	0,3 ccm	cmm CO_2/30 Min.
1	1 ccm	$NaHCO_3$ - NaCl	5
2	Lec.2%	Pg 1:20000	91
3	+	Pg 1:40000	59
4	0,5 ccm	Pg 1:80000	28
5	$CaCl_2$ 0,005m	Pg 1:160000	11
6	+	Pg 1:20000 mit 0,5% Alb.	183
7	1 ccm Tween 20 12,5%	Pg 1:40000 mit 0,5% Alb.	124
8	+	Pg 1:80000 mit 0,5% Alb.	58
9	0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,3 m	Pg 1:160000 mit 0,5% Alb.	41

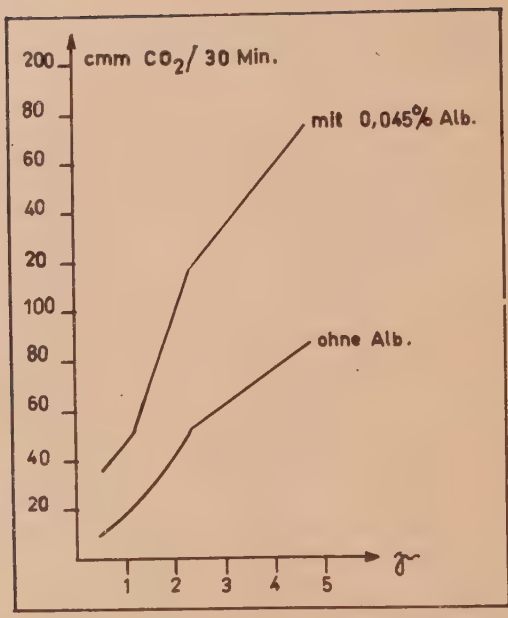

Abb. 3 Aktivierung der Bienengiftphospholipase durch Albuminzusatz.
Ordinate: cmm CO_2/30 Min.
Abszisse: γ/ccm des Bebrütungsansatzes
Ansätze : siehe Tabelle

Ergebnis: Durch Zusatz von 0,5% Albumin zur Giftlösung im Seitenarm (das ergibt eine Konzentration von im Gesamtansatz 0,045 %) kann man die Aktivität der Bienengiftphospholipase auf das Mehrfache steigern.

b) Aktivierung von Bienengift durch Desoxycholsäure (Na-Salz).

Ansatz:

Nr.		1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/30 Min.
1	1 ccm	Tween 20 12,5%	$NaHCO_3$-NaCl	0
2	Lec.2%	"	Pg 1: 15000	119
3	+	"	Pg 1: 30000	65
4	0,5 ccm	"	Pg 1: 60000	24
5	$CaCl_2$ 0,005 m	"	Pg 1:120000	8
6	+	Desoxycholsäure 10%	$NaHCO_3$-NaCl	0,7
7	0,5 ccm	"	Pg 1: 1000	274
8	$NaHCO_3$ 0,3 m	"	Pg 1: 5000	104
9		"	Pg 1:25000	22
10		"	Pg 1:125000	5,2
11		Desoxycholsäure 1%	$NaHCO_3$-NaCl	-3
12		"	Pg 1: 1000	248
13		"	Pg 1: 5000	125,5
14		"	Pg 1:25000	31
15		"	Pg 1:125000	8,5
16		Desoxycholsäure 0,1%	$NaHCO_3$-NaCl	-7
17		"	Pg 1: 1000	32
18		"	Pg 1: 5000	10,5
19		"	Pg 1:25000	3
20	NaCl	NaCl	NaCl	

Ergebnis: Desoxycholsäure aktivierte die Bienengiftphospholipase stark, wie aus dem Vergleich von Kurve III und Kurve IV zu ersehen ist. Die Aktivierung ist jedoch geringer als bei Zusatz von Tween 20 (Kurve I). Offenbar erreicht die Aktivierbarkeit durch Desoxycholsäure ein Optimum oder Maximum, da Zusatz einer 10 - und 1% igen Lösung das Enzym gleich stark beeinflußt.

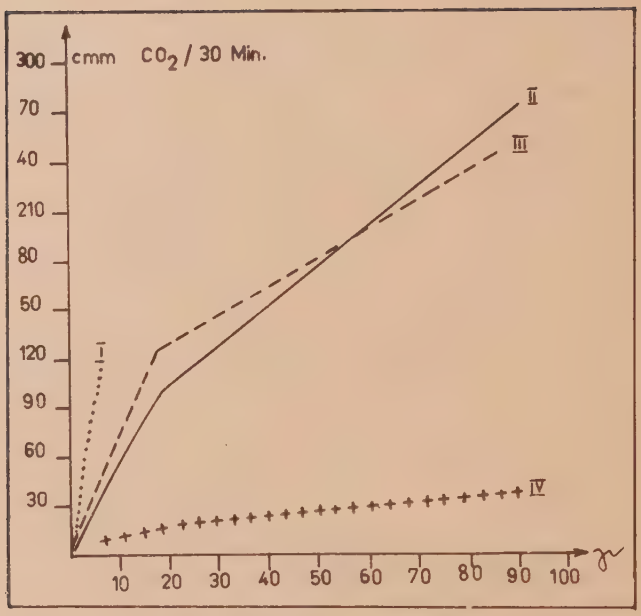

Abb. 4 Aktivierung von Bienengift durch Desoxycholsäure.
Ordinate: cmm CO_2/30 Min.
Abszisse: Konzentration (γ pro ccm des Bebrütungsansatzes)
Ansätze : siehe Tabelle

I= Tween 20 12,5%
II= Desoxycholsäure 10%
III= " 1%
IV= " 0,1%

c) Frage des Einflusses von Triglyceriden und Cholesterin.

Da Lecithin im Organismus häufig zusammen mit Neutralfetten und Cholesterin vorliegen dürfte, erschien uns die Frage als wesentlich, ob etwa durch diese physiologischen Begleiter die Angreifbarkeit beeinflußt wird. Wegen der schlechten Löslichkeit dieser beiden Substanzen konnte die Prüfung nur im Eigelbansatz erfolgen; Olivenöl bzw. Cholesterin wurden im angegebenen Mengenverhältnis mit unverdünntem Eigelb verrührt und daraus die 20% ige Eigelbemulsion hergestellt. Diese "Mayonnaise" erwies sich als relativ stabil.

Ansatz:

Nr.	1 ccm	2 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/30 Min.
1	Eigelb 20%	$NaHCO_3$ 0,15m	Pg 1:40000	97
2	"	"	" 1:40000	102
3	"	"	" 1:80000	78
4	"	"	" 1:80000	68
5	"	"	$NaHCO_3$-NaCl	11
6	Eigelb 20% m. Olivenöl 33%	"	"	2,3
7	"	"	Pg 1:40000	95
8	"	"	" 1:40000	91
9	Eigelb 20% m. Olivenöl 10%	"	$NaHCO_3$-NaCl	5
10	"	"	Pg 1:10000	212
11	"	"	" 1:40000	91
12	Eigelb 20% m. Olivenöl 2%	"	$NaHCO_3$-NaCl	16
13	"	"	Pg 1:10000	191
14	"	"	" 1:40000	94
15	Eigelb 20% m.Cholesterin 10%	"	$NaHCO_3$-NaCl	3,5
16	"	"	Pg 1:10000	182
17	"	"	" 1:40000	104
18	Eigelb 20% m.Cholesterin 2%	"	$NaHCO_3$-NaCl	2
19	"	"	Pg 1:40000	90
20	NaCl	NaCl	NaCl	Thermobarometer

Ergebnis: Weder Olivenöl noch Cholesterin beeinflussen die Bienengift-Phospholipase A unter diesen Bedingungen in nennenswertem Maße.

d) Frage der Hemmbarkeit durch Arsanilsäure.

Da das Verhalten gegenüber Atoxyl (Na-Arsanilat) als Kriterium der Einteilung von Lipasen benutzt wurde, versuchten wir, ähnlich wie NEUMANN und HABERMANN, durch diese Substanz eine Hemmung von Phospholipase A zu erzielen.

Ansatz:

1 ccm	1 ccm	1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/30 Min.
Eigelb 20%	$NaHCO_3$ 0,3 m	Arsanils.1%	Pg 1:40000	89
"	"	"	NaCl-$NaHCO_3$	-10
"	"	"	Pg 1:40000	98
"	"	"	NaCl-$NaHCO_3$	-1,55
"	2 ccm $NaHCO_3$ 0,15 m		Pg 1:40000	101
"	"		NaCl-$NaHCO_3$	-6,0
"	"		NaCl	

Ergebnis: Das Natriumsalz der Arsanilsäure (Atoxyl) inhibiert höchstens angedeutet.

II. Versuche mit gereinigter Phospolipase.

Parallel mit den von uns durchgeführten Experimenten liefen Versuche von HABERMANN, Phospholipase A im gereinigten Zustand zu erhalten. Neben einigen Zwischenstufen der Reinigung konnten wir schließlich auch das Enzympräparat selbst auf einige seiner Eigenschaften prüfen.

1. Ermittlung des pH-Optimums.

Die Ansätze wurden in gleicher Weise angeordnet wie bei Terrificus- und Tripudiansgift (s.S.5u.7).

Nr.		0,5ccm	0,25ccm	0,05ccm	cmm CO_2/30 Min.	pH
1	1ccm	$NaHCO_3$ 0,3m	Plip.1:50000	$NaHCO_3$ 0,3m	129	
2	Lec.2%	"		"	123	8,02
3	+	"	NaCl	"	16	
4	o,5ccm	" 0,6m	Plip.1:50000	" 0,6m	122	
5	$CaCl_2$ o,oo5m	"	"	"	109	8,32
6	+	"	NaCl	"	12	
7	1ccmTween 2o	" 1,2m	Plip.1:50000	" 1,2m	83	
8	12,5%	"	"	"	99	8,62
9		"	NaCl	"	14	
1o	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	Thermobarometer	
11	1ccm	$NaHCO_3$ 0,3m	Plip.1:50000	$NaHCO_3$ 0,3m	60	
12	Lec.2%	"	"	"	52	6,68
13	+	"	NaCl	"	-4	
14	0,5ccm	" 0,6m	Plip.1:50000	" 0,6m	93	
15	$CaCl_2$ 0,005m	"	"	"	79	6,98
16	+	"	NaCl	"	0	
17	1ccmTween 20	" 1,2m	Plip.1:50000	" 1,2m	119	
18	12,5%		"	"	104	7,28
19		"	NaCl	"	5	
2o	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	Thermobarometer	

Durchströmung: 1-10 mit N_2-CO_2 (95:5)
11-20 mit CO_2 (loo%ig)

Ergebnis:

Wie Crotalus-terrificus-Gift und Bienengift (s. WAGNER)hat auch die gereinigte Bienengiftphospholipase ihr Optimum bei pH 8, während unter pH 7,3 und über pH 8,3 die Aktivität steil abfällt.

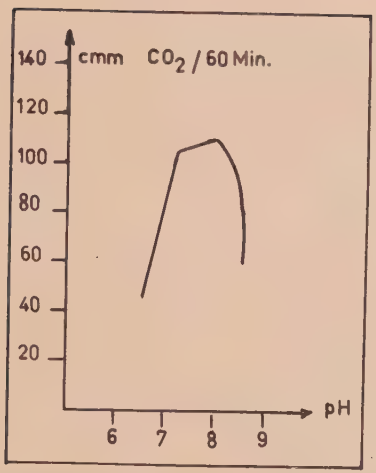

Abb. 5 pH-Abhängigkeit der gereinigten Phospholipase A .
Ordinate: cmm CO_2/60 Min.
Abszisse: pH
Ansätze : siehe Tabelle

2. Aktivierung durch Albumin.

Nach dem Versuch mit Bienengift (s.S.9) war zu erwarten, daß Albumin auch die Aktivität von gereinigter Phospholipase A verstärken würde.Zur Bestätigung diente der folgende Versuch.

Nr.	0,3 ccm	cmm CO_2/30 Min.
1	1 ccm Lec. 2%	$NaHCO_3$-NaCl 5
2	+	Plip. 1:200000 ohne Albumin 161
3	0,5 ccm $CaCl_2$ 0,005 m	" 1:400000 " " 10
4	+	" 1:800000 " " 11
5	1 ccm Tween 20 12,5%	" 1:1600000 " " 7
6	+	" 1:400000 mit 0,5% Albumin 216
7	0,5 ccm 0,3 m $NaHCO_3$	" 1:800000 " " 159
8		" 1:1600000 " " 103
9		" 1:3200000 " " 63

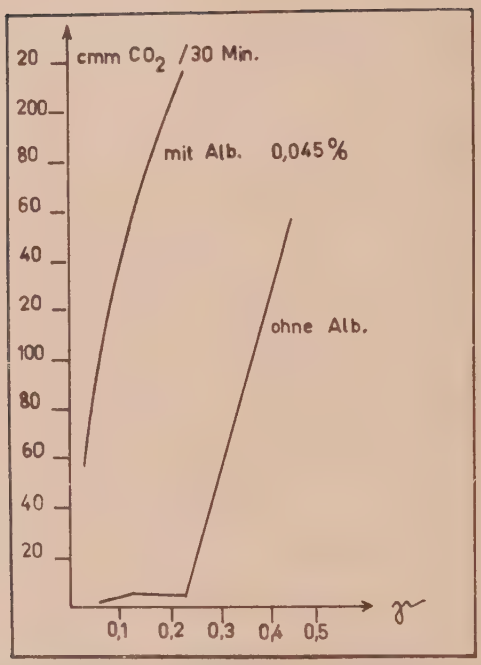

Abb. 6 Aktivierung von gereinigter Phospholipase A durch Albuminzusatz.
Ordinate: cmm CO_2 / 30 Min.
Abszisse: Konzentration (γ / ccm)

Ergebnis: Albuminzusatz erhöht die Aktivität der Phospholipase A um ein Vielfaches. Der Grad der Aktivierung ist bei niedrigen Phospholipase-Konzentrationen besonders stark, Albumin richtet die in diesem Bereich sonst nahezu waagerecht verlaufende Konzentrationsabhängigkeitskurve wieder auf.

3. Zeitabhängigkeit der Aktivität.

a) in Abwesenheit von Albumin.

Ansatz:
1 ccm Lec.2%
0,5 ccm $CaCl_2$ 0,005 m
1 ccm Tween 20 12,5%
0,5 ccm 0,3 m $NaHCO_3$
+
0,3 ccm Plip.

Min.	cmm CO_2, freigesetzt durch 1,5 γ	0,75 γ Phospholipase/Ansatz
10	78	2
20	126	7
30	161	10
40	190	13
50	197	13
60	214	13

b) in Anwesenheit von Albumin.

Ansatz: siehe 3a

Min.	cmm CO_2, freigesetzt durch 0,38 µ Phospholipase/Ansatz	0,19 µ Phospholipase/Ansatz
10	54	28
20	115	68
30	159	101
40	195	127
50	216	150
60	273	175

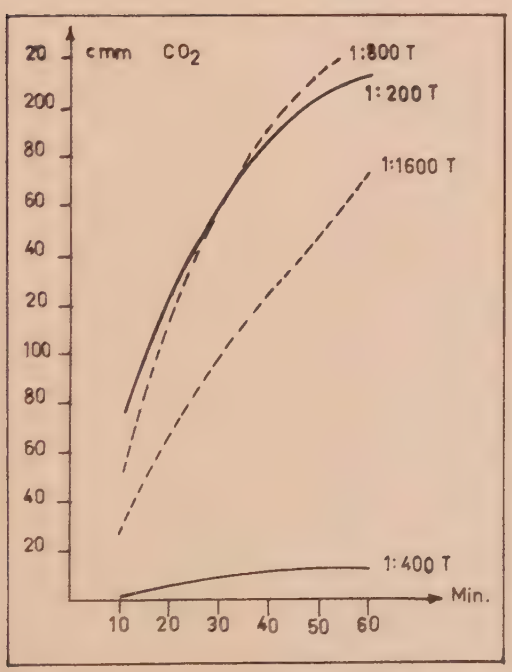

Abb. 7 Zeitabhängigkeit der Aktivität von Phospholipase A.
Ordinate: cmm CO_2
Abszisse: Min.
_____ : ohne Albumin
- - - - - - - - : mit Albumin

Ergebnis: Ähnlich wie WAGNER bei Gesamtgift fanden auch wir bei gereinigter Phospholipase A in An-und Abwesenheit von Albumin eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit. Es steht dies im bemerkenswerten Gegensatz zum Verhalten von Crotoxin. (siehe Abschnitt III)

4. Vergleich verschiedener phospholipasehaltiger Präparate.

Zum Vergleich kamen gereinigte Phospholipase A , gereinigtes Bienengift, Crotoxin und Naia-Naia-Gift, in einem weiteren Versuch getrocknetes Bienengift, FraktionII von Bienengift und Tripudiansgift.

Nr.		0,3ccm			cmm CO_2/ 30 Min.
1	1ccm Lec.	$NaHCO_3$-NaCl			6
2	2%	Plip.	1:150000		114
3	+	"	"		106
4	0,5ccm $CaCl_2$	"	1:300000		66
5	0,005m	Plip.	1:150000	mit 1% Alb.	222
6	+	"	"		232
7	1ccm Tween 20	"	1:300000		185
8	12,5%	"	"		194
9	+	Crotoxin		1:1000	64
10	0,5ccm $NaHCO_3$	Pg.		1:30000	52
11	o,3m	"		"	56
12		Ammodytesgift		1:15000	54
13		"		"	48
14		Naia-Naia		1:15000	160
15		"		"	177
16		"		1:60000	89
17		"		"	87
18		NaCl			Thermobarometer

Ergebnis: Es ergab sich folgende Aktivitätsreihe: Gereinigte Phospholipase A > Naia-Naia-Gift > gereinigtes Bienengift > Ammodytesgift > Crotoxin. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Relationen nur für die 30 Min.-Werte gelten, zumindestens bei Crotoxin,dessen Aktivität mit der Zeit stark ansteigt.

Vergleich von getrocknetem Bienengift (2/ 48), FraktionII von Bienengift und Tripudiansgift.

Nr.	1ccm	2ccm	0,3ccm		cmm CO_2 /30Min.
1	Eigelb20%	0,15m $NaHCO_3$	$NaHCO_3$-NaCl		3
2	"	"	Bienentrockengift	1:5000	> 263
3	"	"	"	1:10000	248
4	"	"	"	1:20000	215
5	"	"	"	1:40000	139
6	"	"	"	1:80000	81
7	"	"	"	1:160000	8
8	"	"	"	1:320000	4
9	"	"	Tripudiansgift	1:5000	> 238
10	"	"	"	1:10000	258
11	"	"	"	1:20000	218
12	"	"	"	1:40000	173
13	"	"	"	1:80000	109
14	"	"	"	1:160000	64
15	"	"	"	1:320000	14
16	"	"	FII	1:25000	> 245
17	"	"	"	1:50000	243
18	"	"	"	1:100000	101
19	"	"	"	1:200000	24
20	NaCl	NaCl	NaCl	Thermobarometer	

Ergebnis: Die Reihenfolge der Aktivität ist, wie auch Abbildung 8 zeigt, FII von Bienengift > Tripudiansgift > Bienengift. Allerdings ist die Aufstellung einer quantitativen Relation unmöglich, da bei diesem Versuch noch kein Albumin zugesetzt wurde und infolgedessen die niedrigsten FII - Konzentrationen relativ wenig wirksam sind.

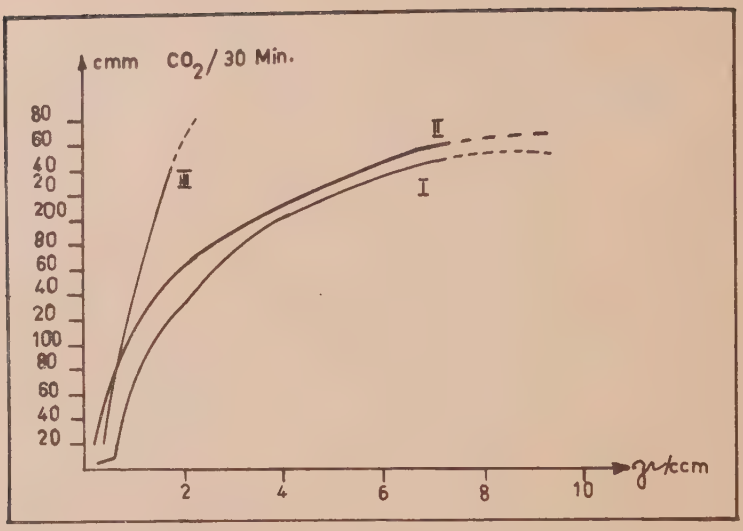

Abb. 8 Vergleich der Aktivität von Bienengift 2/48, F II von Bienengift und Tripudiansgift.

Ordinate: cmm CO_2 / 30 Min.
Abszisse: Konzentration (γ/ ccm)

I Bienengift 2/48
II Tripudiansgift
III Fraktion II

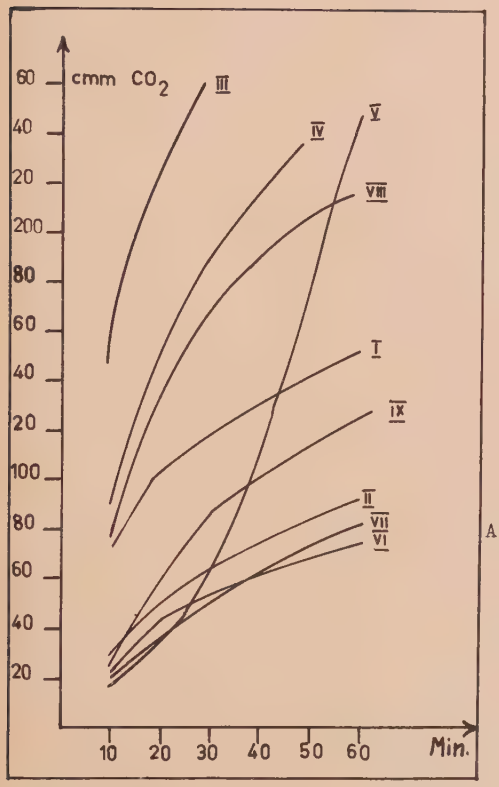

Abb. 9 Zeitlicher Reaktionsablauf von verschiedenen Phospholipase enthaltenden Präparaten.
Ordinate: cmm CO_2
Abszisse: Min

I	Phospholipase A	ohne	Albumin	2,0	⇗/ Ansatz
II	"	"	"	1,0	"
III	"	mit 1%	"	2,0	"
IV	"	"	"	1,0	"
V	Crotoxin	ohne	"	300	"
VI	Pikratgift	"	"	10	"
VII	Ammodytesgift	"	"	20	"
VIII	Naia-naia-Gift	"	"	20	"
IX	"	"	"	5	"

Ergebnis: Den zeitlichen Verlauf der Lecithinspaltung durch einige phospholipasehaltige Präparate gibt Abb. 9 wieder. In allen Fällen mit Ausnahme von Crotoxin nimmt die Spaltungsgeschwindigkeit mit der Zeit ab, nur beim Crotoxin nimmt sie zu.

III. Versuche mit Crotoxin.

1. Zeitabhängigkeit von Crotoxin mit und ohne Albuminzusatz.

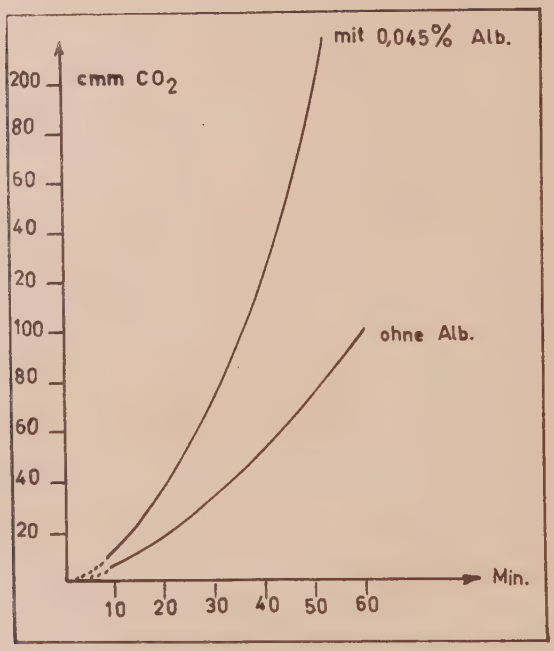

Abb. 10
Ordinate: cmm CO_2
Abszisse: Min.

Ergebnis: Im Gegensatz zur Bienengift-Phospholipase A zeigt Crotoxin, eine phospholipasereiche Fraktion aus Crotalus-terrificus-Gift, in Gegenwart und Abwesenheit von Albumin eine eindeutige Aktivitätszunahme mit der Zeit. Wie man sich dieses Phänomen zu erklären hat, bleibt offen. Möglicherweise muß vor Beginn der Reaktion erst eine Enzymsubstratbindung

eingetreten sein, vielleicht ändert sich auch die Löslichkeit von Crotoxin in Gegenwart der zugefügten Aktivatoren Ca^{++} und Tween 20. Auch eine Beeinflussung der Reaktion durch die entstehenden Spaltprodukte wäre denkbar.

2. Aktivitätsänderung von Crotoxin bei Zusatz von Albumin.

Ansatz:

Hauptgefäß: 1 ccm Lec.2% + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,005 m +
1 ccm Tween 20 12,5% + 0,5 ccm 0,3 m $NaHCO_3$

Seitengefäß: 1. 0,3 ccm $NaHCO_3$-NaCl
2. " Crotoxin 1:2000
3. " " 1:2000 mit 0,5% Albumin

cmm CO_2/30 Min. zu 1. 5 (Leerwert)
" 2. 33
" 3. 68

Ergebnis: Albuminzusatz führt zum Anstieg der Crotoxin-Aktivität, jedoch ist die Steigerung nicht so groß wie bei gereinigter Phospholipase A aus Bienengift. Es wird hier nur eine Verdoppelung der Lecithinspaltung in 30 Minuten erreicht. Eventuell liegt dies daran, daß man hundert- bis zweihundertmal mehr Crotoxin als gereinigte Phospholipase dem Ansatz zufügen muß, um eine Lecithinspaltung gleicher Größenordnung zu erreichen. Dadurch ist der Eiweißgehalt bei den Crotoxin-Versuchen von vornherein relativ hoch.

Besprechung.

Wie die vorliegenden Versuche zeigen, läßt sich nicht nur die Phospholipase A von Bienengift, sondern auch die von verschiedenen Schlangengiften unter Standardbedingungen manometrisch verfolgen. Auf Grund unserer Erfahrung, daß Albumin die Aktivität sehr stark erhöht, konnten wir diese Bedingungen noch wesentlich verbessern. Dies fällt bei Gesamtgiften weniger ins Gewicht wohl aber z.B. beim Bienengift bei der Testung der Reinigungsstufen von Phospholipase A, sobald diese nicht mehr die nach HABERMANN aktivitätssteigernde Fraktion I enthalten.Wahrscheinlich tritt hier das Phänomen der " ausgleichenden Aktivierung " auf, welches WILLSTÄTTER bereits bei der Reinigung von Lipasen beschrieb.

Auch Desoxycholsäure aktiviert Phospholipase A stark, allerdings schwächer als das in unserem Standardansatz verwendete Tween 20. Da überdies Desoxycholsäure Ca^{++} bindet und ihr Na-Salz puffernd wirkt, sodaß der pH-Wert des Ansatzmediums sich nur schwer errechnen läßt, wurde auf die Verwendung dieses " physiologischen " Lösungsvermittlers anstelle von Tween 20 verzichtet.Immerhin kann daran gedacht werden,daß Gallensäuren beim normalen Lecithinabbau im Darm vielleicht ähnlich aktivieren wie in vitro.Leider war uns mangels geeigneter Enzympräparate aus Pankreas und Darmschleimhaut nicht möglich, diesem Problem weiter nachzugehen.

Auch unter den verbesserten Standardbedingungen gelang es noch nicht vollkommene Übereinstimmung der an verschiedenen Versuchstagen erhaltenen Werte zu erzielen; deshalb wurden alle Werte stets in Bezug zur gleichzeitig mitlaufenden Kontrolle gesetzt.Die Ursache dieser Streuung von Tag zu Tag konnte HABERMANN nach Beendigung unserer Versuche aufdecken: es muß der Silikonierung der Reaktionsgefäße ein Scheuern vorausgehen, weil sonst unlösliches Material aus dem Chromschwefelsäurebad an der Wand haften bleibt und die Auflegung eines dichten Silikonfilms verhindert.

Die Phospholipasen verschiedener tierischer Gifte verhalten sich unter unseren Arbeitsbedingungen bis auf eine Ausnahme sehr ähnlich.So lag das pH-Optimum von Naia-tripudians bei pH 8,3 und das von Crotalus-terrificus-Gift bei pH 8,0 .WAGNER fand es bei Benutzung von gereinigtem Bienengift unter Standardbedingungen bei pH 8,0 .Auch das pH-Optimum des reinsten Phospholipase-Präparates von HABERMANN liegt bei 8,0 .

Eine Sonderstellung nimmt die Phospholipase A des Crotalus-terrificus-Giftes ein, die in angereicherter Form im Crotoxin vorliegt. Während die Aktivität aller anderen untersuchten Enzympräparate mit zunehmender Reaktionsdauer abfällt, steigt die des Crotoxins, gleichgültig ob mit oder ohne Albuminzusatz, und auch die von Crotalus-terrificus-Gift im Laufe der ersten Stunde an. Für diese Erscheinung sind mehrere Deutungen möglich. Zum Beispiel könnte sich das Enzym in einer zeitverbrauchenden Reaktion in einen aktivierenden Komplex innerhalb des Reaktionsansatzes einfügen. Es könnten aber auch Spaltprodukte das Enzym aktivieren oder den Effekt eines Inhibitors aufheben. Die Klärung dieser speziellen Fragen lag nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassung.

Die Reaktionbedingungen bei der manometrischen Bestimmung von Phospholipase A verschiedener Herkunft und verschiedenen Reinheitsgrades wurden studiert.

Bei Versuchen mit ungereinigten bezw. wenig gereinigten Enzympräparaten lag die Streuung innerhalb desselben Ansatzes bei $\pm 5\%$. Ansätze, welche an verschiedenen Tagen untersucht wurden, zeigten dagegen stärkere Unterschiede. Auch Eigelb verschiedener Herkunft wurde unter gleichen Bedingungen verschieden stark gespalten. Die Ursache hierfür ist noch nicht geklärt.

Das pH-Optimum liegt für Naia-tripudians-Gift bei pH 8,3, für Crotalus-terrificus-Gift bei pH 8,0.

Desoxycholsäure und Albumin aktivieren Bienengift-Phospholipase A stark.

Bei Versuchen mit gereinigten Enzympräparaten liegt das pH-Optimum der Bienengift-Phospholipase bei pH 8,0. Die Aktivität nimmt im Verlaufe der Reaktion ab. Dieses Enzym wird durch Albumin stärker aktiviert als ungereinigtes bezw. wenig gereinigtes Bienengift.

Crotoxin ist sehr viel weniger wirksam als Bienengift-Phospholipase. Seine Aktivität steigt aber im Verlaufe der Reaktion an; sie wird durch Zusatz von Albumin gesteigert.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit im Pharmakologischen Institut sage ich hiermit Herrn Professor Dr. Dr. N e u m a n n meinen herzlichen Dank.

Für die persönliche Hilfsbereitschaft sowie für die liebenswürdige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Privatdozenten Dr. H a b e r m a n n aufrichtig bedanken.

Literaturverzeichnis.

Belfanti, u. Arnaudi, Bull. Soc. Int. microb. 4, 399 (1932).

De, S. S., Indian J. Med. Res. 27, 793 (1940).

Delezenne, C. u. Fourneau, E., Bull. Soc. chim. France, 15, 421 (1914); zit. n. Chem. Zbl. 85, II, 52 (1914).

Ercoli, A., in Nord-Weidenhagen, Hdb. d. Enzymologie, 480, I (1940).

Fairbairn, D., J. biol. Chem. 157, 633 (1945).

Fleckenstein, A. u. Gerkhardt, H., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pharmakol. 214, 135 (1951).

Gronchi, V., Sperimentale, 90, 223 (1936).

Habermann, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmakol. 218,108 (1953); 222, 173 (1954).

Habermann, E. u. Neumann, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 292, 179 (1954).

Hanahan, D. J., J. biol. Chem. 195, 199 (1952).

Hughes, A., Biochem. J. 29, 437 (1935).

Neumann, W., Naturwissensch. 41, 322 (1954).

Neumann, W. u. Habermann,E. u. Amend, G., Naturwissensch. 39, 286 (1952).

Neumann, W. u. Habermann, E., (I), Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 296, 166 (1954).

Neumann, W. u. Habermann, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmakol. 222, 367 (1954).

Neumann, W., Habermann, E. u. Hansen, H., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmakol. 217, 130 (1953).

Slotta, K. H., u. Szyszka, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 258 (1938)

Wagner, Chr., Diss. Würzburg (1956).

Willstätter, R., Z. 125, 93 (1923).

Zeller, E. A., in Sumner-Myrbäck, The Enzymes, New Nork, 1, 2 S. 986 (1951).

Zamecnik, P. C. u. Lipmann, F., J. exp. Med. 85, 395 (1947).

LEBENSLAUF

Am 2.Februar 1929 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Oskar Seehawer und seiner Ehefrau Helene, geb.Lämmerhirt, in Kassel geboren. Von 1935 bis 1939 besuchte ich dort die Volksschule und von 1939 bis 1943 die Mittelschule.Nach unserer Evakuierung legte ich nach weiteren zwei Jahren Mittelschulbesuchs in Meiningen die mittlere Reife ab.Ab 1947 war ich Schülerin der Oberschule in Bad Salzungen und schloß hier 1948 mit dem Abitur ab.

Mein zahnmedizinisches Studium begann ich 1949 im Sommersemester an der Universität Würzburg.Im Februar 1952 unterzog ich mich der zahnärztlichen Vorprüfung, im Oktober 1954 legte ich das Staatsexamen ab.

Vom November 1954 bis Juni 1955 war ich als Volontärassistentin an der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- u. Kieferkrankheiten in Würzburg tätig.Anschließend volontierte ich noch über ein Jahr als Assistentin bei Dr. Otto Schoor, Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Brigitte Fischer

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG KOLOFFSTRASSE 5